牛奶微生物群落与奶牛乳腺健康和犊牛胃肠道发育的关系

汪　悦[1]　王　炳[1]　童津津[1]　蒋林树[1*]　熊本海[2*]

(1.北京农学院动物科学技术学院，奶牛营养学北京市重点实验室，北京　102206；2.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，北京　100193)

摘　要：微生物非培养技术的重大进展以及生物信息学技术的发展，使得人类对牛奶微生物这一复杂的群落有了新的认识，即牛奶微生物群落具有丰富的多样性和多方面的生物学作用，并且可以直观反映奶牛机体的代谢水平并影响新生犊牛的营养代谢与健康。因此，本文总结了奶牛牛奶微生物群的最新研究成果，重点描述了牛奶微生物的内源性途径假说，讨论了其在奶牛乳腺健康与犊牛胃肠道发育中的重要作用，并概述了包含16S基因组学和宏基因组学等在牛奶微生物研究中的应用。

关键词：奶牛乳腺健康；微生物群落；牛奶；犊牛；胃肠道

中图分类号：S823

牛奶中的复杂微生物菌群近年来越来越受到人们的关注，而先进的组学技术的发展能够让人类对牛奶微生物群有更加详细的了解，进而引发了大量的研究热潮。从现有的研究中，我们已经意识到，由于奶牛机体内微生物的复杂性和互动性，使其拥有多种多样的微生物群落，并且这些微生物群落在奶牛生物学中占有重要地位，对奶牛健康状态有重要影响[1]。有研究发现，奶牛胃肠道微生物群有着复杂而紧密的关联[2]。而近年来，牛奶中的微生物群落也已逐渐从奶牛机体的各个解剖部位得以分离鉴定，从最明显的部位，如皮肤和泌尿生殖道，到较为不明显的部位，如呼吸道。并且还包括先前认为绝对没有微生物的区域，如胎盘[3]。早期研究认为，乳腺和其中所含的乳汁也被认为是无菌的，在牛奶中发现的微生物一直被认为是外部污染的结果。然而最近，这一观点受到了基于免疫培养技术与更为高精度的分子方法的质疑——有研究提出了牛奶微生物的内生途径假说[4]。因此，本文旨在对牛奶微生物的

收稿日期：2017-08-15

基金项目："十三五"国家重大科技专项（2016YFDO700201）；北京市农业局北京市现代农业产业技术体系奶牛创新团队

作者简介：汪　悦（1993-），女，青海西宁人，硕士研究生，研究方向为奶牛营养与免疫。E-mail: wangyue9313@163.com

*通信作者：蒋林树，教授，硕士生导师，E-mail： kjxnb@vip.sina.com；熊本海，教授，博士生导师，E-mail: xiongbenhai@caas.cn

来源、组成、研究手段以及牛奶微生物群对犊牛生长发育的重要影响等进行综述，为牛奶微生物的研究与奶牛乳腺健康和犊牛生长发育的关系提供一定的理论基础。

1 牛奶微生物群落来源

牛奶中的微生物一直被认为是外部感染的结果，主要是奶牛所处环境中的微生物通过乳腺皮肤或口腔带入机体内[5]。而近来有研究证实了牛奶中微生物的内生途径，即奶牛机体内的微生物具有互动性，一些生理部位的微生物完全有可能通过某些途径进入到乳腺进而产生于牛奶中[6]。

1.1 外源致病菌入侵

外源致病菌入侵是奶牛乳腺炎症诱发的主要因素之一。Mor 等[7]研究发现,牛棒状杆菌（*Corynebacterium bovis*）、无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）以及凝固酶阴性葡萄球菌（*Coagulase-negative Staphylococcus*）是造成隐性乳房炎的主要外源致病菌。引起乳房炎的致病菌，根据其传播特点，大体可分为 2 类：一类是接触传染性病原微生物，它定殖于乳腺并通过挤奶传播，包括无乳链球菌、停乳链球菌（*Streptococcus dysgalactiae*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和支原体（*Mycoplasma*）；另一类为环境性病原体，包括大肠杆菌（*Escherichia coli*）、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）、产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）、沙雷氏菌（*Serratia*）、变形菌门（*Proteus*）、假单胞菌（*Pseudomonas*）等[8]。然而，细菌素以及牛奶中特定成分所释放的抗微生物分子可能在抑制潜在病原体的爆发中起到一定的作用，从而防止乳房内感染[9]。Quigley 等[10]研究表明，奶牛微生物群体具有宿主依赖性，并指出其组成可能在确定它们是否会患有乳腺炎时起作用。

从对奶牛乳腺感染及微生物诱发乳腺炎的作用研究中发现，肠道微生物群可能是诱发乳腺炎的潜在微生物群[11]。有研究表明，人乳寡糖（HMO）具有调节肠道微生物群的能力，而牛奶中也存在与人乳中结构类似的寡糖——牛乳寡糖（BMO）。因此，可以推测，BMO 也可能影响奶牛乳腺的微生物群落[12]。有趣的是，BMO 属于牛奶中的特定分子成分，它能够反映奶牛的血型特征，并受到遗传因素的控制[13]。研究证实，葡萄球菌（*Staphylococcus*）是诱发奶牛乳腺炎的主要致病菌，并且它仅与 BMO 的特定类型结合。这将表明，乳腺炎的易感性不仅可以通过牛奶的微生物组成或暴露的特定病原体来判定，而且还可以通过奶牛的遗传构成和牛奶中存在的相应 BMO 类型来判定[14]。

1.2 内源性途径假说

一直以来，人们都认为在牛奶中发现的微生物是由外部环境，如乳腺皮肤或后代的口腔污染造成的。然而，最近的一些研究并不支持这样的观点，即牛奶中微生物的存在不仅仅是外部定殖的结果。已有研究证明，牛奶中的微生物除了在细菌组成上不同之外，存在于同一宿主乳腺中的细菌与在皮肤中发现的同种细菌在基因型上有较大的差异。这说明，乳房皮肤和乳头管不能被认为是牛奶微生物群的唯一制造者[15]。除此之外，细菌如双歧杆菌是严格厌氧的，这使得皮肤不太可能成为这类细菌传播者。这些观察结果提供了微生物内生途径的可能性[16]。

事实上，宿主微生物群落并不构成独立的环境，而是相互关联且不断互动交流的。因此，其他解剖学部位的微生物完全可能以某种方式进入乳腺[17]。有研究基于一些微生物离开肠腔，穿过肠系膜淋巴结并到达乳腺的能力，描述了“肠道—乳腺通路”的存在（图 1）[18]。牛奶微生物群的内生起源假说已经通过在小鼠中进行的不同研究得到证实[19]。虽然微生物跨越肠系膜屏障并到达其他身体部位的机制尚未完全清楚，但研究表明这些可能与免疫细胞，特别是树突状细胞（DC）的结构与功能有关[20]。事实上，DC 能够通过打开肠细胞之间的紧密连接来对肠内容物进行采集，并通过其树突到达内腔，而不损害上皮屏障完整性。基于这种采集能力，这些细胞可以携带活的共生细菌，并将其携带到肠系膜淋巴结。一旦细菌保持存活多达数天，并能通过黏膜相关淋巴系统，就有机会扩散到其他远处的黏膜表面，包括乳腺。事实上，在泌乳期间，肠道相关淋巴组织的细胞能够通过淋巴管和外周血循环传递到乳房[21]。Yozwiak 等[22]表明，在哺乳期间，人类外周血单核细胞和母乳细胞含有细菌及其遗传物质。此外，已有报道在人类受试者的血液中存在活的乳酸菌，这进一步表明了一些肠道微生物群的成员可能具有相当强的能力以可行形式前往其宿主的远端肠外部位[23]。研究还发现，在妊娠期和哺乳期的小鼠肠中细菌易位频率增加，并且当细菌存在于哺乳期乳腺组织中时 DC 成为其载体[23]。

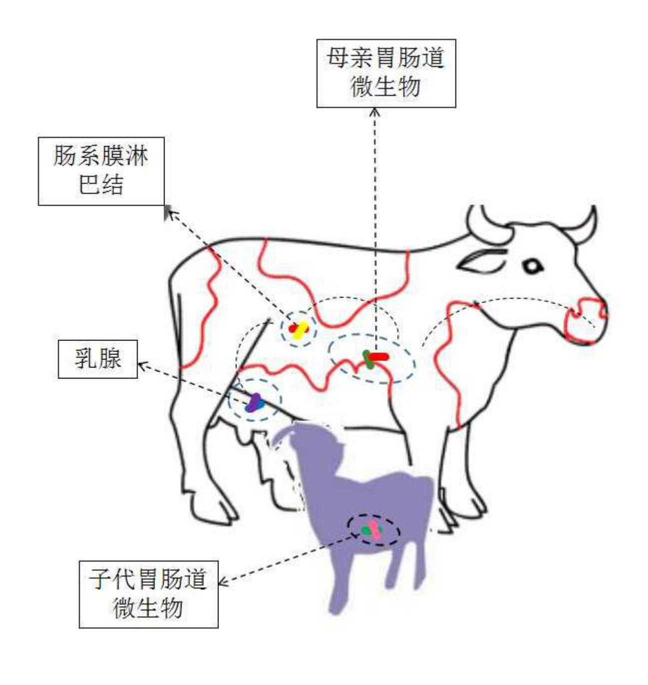


图 1 反刍动物中肠道—乳腺通路的假说

Fig.1 Hypothesis of intestinal tract-mammary gland pathway in ruminants[18]

除了运输肠道微生物群落的可行性之外，这种机制还具有引导后代免疫系统识别与启动共生微生物相关分子模式的作用，以便对它们产生适当的反应[24]。这种迁移可以选择性地发生，也就是说，某些细菌可被免疫细胞识别并被转运到牛奶中，而其他可能不会被识别，或者免疫细胞可能会摄取所有的微生物，但是只有那些能够逃脱死亡的细胞才能被运送到乳腺[24-25]。Garcia-Garcerà等[26]报道了有关奶牛肠道细菌转移到乳腺中的研究结果，支持了反刍动物内源性“肠道—乳腺通路”的存在。该研究通过焦磷酸测序条码标记的 16S rDNA 扩增子研究了健康泌乳牛的粪便、牛奶和血液白细胞的微生物组成和多样性，结果表明，在来自同一头奶牛的 3 种样品中都共同存在红球菌属（*Rhodococcus*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和消化链球菌科（Peptostreptococcaceae）；为了避免外部污染并防止乳头管的拉伸或损坏，该试验使用导管通过重力将牛奶收集到无菌容器中。这些细菌在 3 种环境中共同存在的这一事实，有力地支持了乳腺与肠道之间微生物成分通过白细胞循环相互迁移的这一机制[27]。然而，负责将微生物群从肠系膜淋巴结转运到牛奶中的细胞类型仍有待确定。需要进一步研究来剖析反刍动物肠道微生物运输到乳腺及其循环的机制，这可能对反刍动物及其后代乃至人类消费者的健康产生重要影响。

2 牛奶微生物群落组成

牛奶中含有复杂多样的微生物群落。研究表明，每毫升牛奶中就能达到几个菌落单位的

丰度[28]。在健康的奶牛和乳腺所分泌的乳汁中也存在大量微生物群落[29]。近年来，牛奶微生物群已经成为独立的研究课题，一方面旨在了解其在奶牛及其后代的生理与健康中的作用，另一方面，大多数关于奶牛微生物群的研究已经开始重点关注当牛奶直接消费或加工为乳制品时，微生物菌群如何变化（表 1）[30]。

表 1　健康牛奶微生物群组成

Table 1　Composition of healthy milk microbial community[30]

种类 Types	微生物种属 Genus of microbial community
初乳 Colostrum	乳链球菌(*Streptococcus lactis*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)等
生鲜乳 Fresh milk	溶血性链球菌(*Hemolytic streptococcus*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、布鲁氏杆菌(*Brucella*)、乳房炎链球菌(*Streptococcus mutans*)、沙门氏菌（*Salmonella*）、痢疾杆菌（*Shigella*）、蛋白质分解菌（proteolytic bacteria）、脂肪分解菌（fat decomposition bacteria）、产酸菌（acid bacteria）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）、罗尔斯通菌（*Rhodes bacteria*）、假单胞菌（*Pseudomonas*）、鞘氨醇单胞菌（*Sphingomonas* sp.）、寡养单胞菌（*Oligospora*）、嗜冷杆菌（*Aerobic bacteria*）、慢生根瘤菌（*Slow rhizobia*）、气单孢菌（*Aeromonas*）、葡萄球菌（*Staphylococcus*）等
巴氏杀菌奶 Pasteurized milk	嗜热菌（*Thermophilic bacteria*）、芽孢杆菌（*Bacillus*）、耐热性菌等

Masoud 等[31]研究了健康奶牛的牛奶微生物组成成分，发现牛奶中最丰富的属是链球菌属（*Streptococcus*）和葡萄球菌属。而其他研究显示乳酸菌（lactic acid bacteria）数量较多，其次是链球菌和葡萄球菌[32]。Montel 等[33]在牛奶的巨噬细胞中发现了更高水平的细菌序列，分别是厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）和拟杆菌门（Bacteroidetes）。同一研究表明，健康牛奶的核心微生物组成包括葡萄球菌和链球菌，而它们在健康母牛之间观察到高度的个体间变异性。另一项牛奶微生物突变体研究显示，易发生菌种突变的主要为变形菌门（65%）、厚壁菌门（34%）、假单胞菌属（61.1%）和葡萄球菌属（33.4%）[34]。而所有这些差异都会与地理、遗传或饮食等因素相关，应进一步研究。Valles-Colomer 等[35]使用细菌 16S rDNA 基因的焦磷酸测序对来自 10 头不同奶牛的牛奶样进行细菌 DNA 多样性检测。在试验中，也对从同一头奶牛的健康乳房获得的牛奶样品的微生物群体进行了比较。

研究结果显示，不同健康牛奶样品的微生物种类之间存在显著差异。最丰富的种属是：罗氏假单胞菌(*Pseudomonas syringa*)、假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)、嗜麦芽寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas maltophilia*)、根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、棒状杆菌属、嗜糖假单胞菌属（*Pelomona*)和葡萄球菌。而在单一奶牛健康乳房中获取的牛奶样品中发现，假单胞菌和丛毛单胞菌（*Pseudomonas* sp.）的丰度显著高于乳酸杆菌[35]。在最近发表的一项研究中，Tveit 等[36]详细描述了来自一系列体细胞数（SCC）较低且乳房未受感染的牛奶样品的微生物多样性。从健康乳区获得的所有样品中都存在非分类的毛螺菌科(Lachnospiraceae)和丙酸杆菌，这些菌属可被认为是健康牛奶的核心微生物群。在大多数具有极低 SCC 的牛奶样品中，其他微生物种属也同样被普遍发现：拟杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、厌氧球菌属（*Anaerobic bacteria*）、乳杆菌属、卟啉单胞菌属（*Porphyromonas*）、科莫他属（*Komo genus*）、福氏杆菌属（*Freundella* spp.）和肠球菌属。某些细菌属，如乳杆菌属和类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）与奶牛乳房健康有关。

3 牛奶微生物群落检测方法

传统的细菌分类与鉴定中，主要依据的是形态学特征、生理生化反应、生态学特征以及血清学反应等，如平板菌落计数法以及革兰氏染色法等。但这些传统方法都存在检测周期长、操作繁琐等缺点，并且对十分相似的细菌难以进一步区分[37]。随着分子生物学技术的发展，整个微生物基因组和宏基因组的表征可能是基于 16S rDNA 的靶序列或由宏基因组的广泛测序来完成的。前一种方法依赖于 16S rDNA 基因片段（16S 基因组学）的 PCR 扩增与测序的组合，因此，它可以表征微生物群落中的细菌组分[38]。

在 16S rDNA 测序研究中，设计了 1 对所谓的“通用”引物以结合保守区域并扩增捕获分类信息的可变区域[39]。对扩增的 16S rDNA 片段库进行测序，可以将每个读数最准确地分配给其特定的分类单元。然后，可以估计每个分类群的相对数量[40]。Hettich 等[41]利用 16S rDNA 测序方法研究 20 个来自低 SCC 的健康牛奶样品，发现无性系细菌序列几乎不存在，虽然检测到卟啉单胞菌属序列，但与其在乳腺炎牛奶样品中的检测率相比，出现率较低。因此，推测某些厌氧菌可能只作为机会性病原体。然而，基于扩增子的宏基因组学受到几个限制，包括由于 PCR 偏差导致的多样性丧失和多样性估计的变异性等[42]。

鸟枪法宏基因组学通过扩增特异性靶位点，提取整个宏基因组 DNA，将其还原成片段

并进行测序。这使得在整个菌落的所有 DNA 基因组中产生了能够与基因组位置相对齐的大量基因组序列[43]。Muth 等[44]通过鸟枪法宏基因组学技术对杂交奶牛的牛奶微生物结构进行分析。分析产生了 63 个基因，11 个基因座和 78 万个碱基对（Mb），并存在于在 798 56 114 个序列中，其研究结果揭示了肠杆菌成员在牛奶微生物中所占的主导地位，其次是假单胞菌属（*Pseudomonadales*）、芽孢杆菌（*Bacillales*）和乳杆菌（*Lactobacillales*）。同时，代谢分析表明氟喹诺酮类、甲氧西林、铜、钴、锌、镉等作为抗生素进入奶牛机体后，其体内表现出多种具有抗药性潜力的微生物体的序列，例如金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯杆菌以及表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）。

4 牛奶微生物数量与组成与奶牛乳腺健康

参照国标 GB 19301-2010，当鲜乳中的细菌总数达到 2×10^6 CFU/g（或 CFU/mL）时，鲜乳的质量安全就会受到影响，超过这个限值的鲜奶样品是不允许用作原料乳应用在乳制品的生产加工中的。同时，生鲜乳中超高的细菌总量也标志着奶牛乳腺内部定殖着大量微生物，这其中就有可能存在着威胁乳腺健康的病原微生物[45]。除数量因素外，牛奶中微生物群的组成也是影响奶牛乳腺健康的重要因素。外源致病菌（如金黄色葡萄球菌、乳房链球菌等）入侵奶牛乳腺后，扰乱奶牛正常微生物群发育环境，引发乳腺炎症，容易导致牛奶 SCC 升高，产奶量下降等一系列不利影响；相反，一些益生菌（如乳酸菌、双歧杆菌等）在奶牛机体内的大量定殖能够对奶牛的乳腺健康、牛奶质量等带来有益影响。

刘艳艳[46]利用荧光定量 PCR 方法对 100 份鲜牛奶样品微生物总数进行测定，结果表明，有 37 份生鲜牛奶样品的荧光定量 PCR 循环阈值（CT）小于 29.81，结果提示为危险样品，即样品中的细菌总量已超过 2×10^6 CFU/mL，随后对生产这 37 份生鲜牛奶样品的奶牛进行乳房健康检测，发现其中 16 头奶牛患有临床乳腺炎症，而其余的 21 头奶牛，通过 CMT（加州乳房炎检测法）检测，观察到不同乳区有隐形乳房炎的症状表现。Hettich 等[47]在研究不同微生物对奶牛乳腺健康的作用时发现，将从牛奶中分离出的乳酸乳杆菌亚种接种到奶牛机体内能促使其血液和乳中的免疫球蛋白同种型水平和记忆细胞增殖。Tanca 等[48]研究表明，使用乳酸菌与双歧杆菌刺激奶牛乳腺后淋巴细胞在体外不与金黄色葡萄球菌表面抗原反应。这说明，益生菌可以成为在干奶期防止奶牛乳腺炎的天然有效的抗生素替代物，并且作为免疫调节剂刺激局部和系统的防线。Winter 等[49]利用宏基因组学技术在患有亚临床乳腺炎的奶牛

牛奶中检测到大约 56 种具有不同丰度的不同物种。发现大肠杆菌是其中最主要的，其次是铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、门氏假单胞菌（*Pseudomonas pseudomonas*）以及蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）。有趣的是，他还发现了所研究的牛奶样品中还存在葡萄球菌的噬菌体。Tang[50]研究了饲粮添加富硒益生菌(selenium-enriched probiotics,Se-Pro)对奶牛乳房炎和乳汁 SCC 的影响。对照组喂基础饲粮，Se-Pro 组添加 108.2 g/（头•d）Se-Pro，结果表明，与对照组相比，Se-Pro 组的奶牛其血液硒含量显著升高，并且乳房炎乳区阳性率下降了 35%。奶牛血液中硒含量增加，有助于减少奶牛 SCC、降低乳房炎的发病率,增强嗜中性粒细胞的功能。综上表明，牛奶中微生物数量与组成不仅是反映奶牛乳腺健康的关键指标，一些益生菌还有助于奶牛的乳腺健康。

5 牛奶微生物对犊牛胃肠道微生物群落定殖的影响

牛奶中含有免疫细胞和各种各样的活性分子，包括糖、核苷酸、脂质、免疫球蛋白、抗微生物蛋白、细胞因子和其他免疫调节因子[51]，而母乳对其后代的生长发育会产生较大的影响，其中之一是将微生物传播给后代的正处于发育过程中的胃肠道[52]。

5.1 母牛分娩

Morrow 等[53]研究发现奶牛的分娩方式对牛奶中微生物也会有很重要的影响，试验分别选取阴道分娩和剖宫分娩的奶牛牛奶，并运用 16S rDNA 基因扩增子的焦磷酸测序的方法对 2 种牛奶样品中微生物多样性进行检测。结果发现，与剖宫分娩的牛奶样相比，采用阴道分娩方式的奶牛其牛奶样品中微生物多样性更高；而与阴道分娩方式的牛奶样品相比，采用剖宫分娩方式的奶牛其牛奶样中葡萄球菌、双歧杆菌相对丰度较高，链球菌含量较低。此外，分娩方式还会影响新生犊牛肠道微生物群的组成[54]。与阴道分娩的新生犊牛相比，由剖宫分娩的新生犊牛其肠道微生物群与其母代的相似性显着降低，并且微生物多样性也同样较低[54-55]。

分娩哺乳动物的微生物群落定殖为其初分娩后代提供引导免疫成熟的重要刺激物，后代微生物群落的形成受到出生前和出生后因素的影响，包括遗传和环境变量（孕龄、分娩方式、护理和营养）[56]。根据以上的研究数据及观察结果，我们假设围产期因素能够通过母乳的微生物转移影响新生犊牛健康，那么在围产期期间对奶牛进行微生物转移可以为奶牛调节微生物的饲粮策略提供新的目标，以减少非传染性疾病的发生[57]。此外，这些研究数据可能

有助于提示牛场适当改善繁殖方式，这对奶牛健康有重大影响。

牛奶中微生物对其他健康因素的影响，包括乳杆菌属、拟杆菌属和梭菌属，可影响黏蛋白产生，增强黏膜通透性，维持 T 细胞平衡以及减轻黏膜炎症[58]。对无菌小鼠进行的研究表明，免疫系统功能的完全发展需要微生物的早期定殖(各种细菌经常从不同环境进入到奶牛机体，并能在一定部位定居和不断生长、繁殖后代，这种现象通常称为“细菌定殖”)[59]。牛奶中的微生物对奶牛免疫系统对抗病原体和共生细菌等功能至关重要。而后代的肠道微生物及其免疫力的演变，是由母代乳腺通道产生的乳汁微生物的运动、定殖造成，并通过母代的乳腺与哺乳犊牛的口腔微生物群的相互联系，进而在哺乳期间同步发育和进化[60]。

Abreu 等[61]研究表明，牛奶微生物群体会沿着哺乳期的进行而发生一系列变化。这进一步提示了牛奶微生物群在形成后代肠道微生物群中的作用。事实上，奶牛体内藏有另外一个非常复杂的微生物群落，即瘤胃微生物群，它起到了消化植物并将其他不消化物转化为有用的化合物的关键作用。瘤胃中的微生物定殖几乎随时发生，近来有关于瘤胃微生物群落的研究已经证明，犊牛体内存在成熟的微生物功能。通过焦磷酸测序法，已经证明纤维素分解菌早在新生犊牛出生后 1 天就已经存在于瘤胃中，并且在第 3 天有所增加。Vankerckhoven 等[62]证明了瘤胃中某些关键细菌从犊牛降生的第 1 天开始就已经存在，而当时新生犊牛只被供给初乳，也就是在摄入饲料之前。据此推断，新生犊牛胃肠道内的这些初期微生物群落可能是由母亲通过皮肤、产道、乳汁或唾液传播的。

5.2　犊牛饲喂

目前的牛场管理方式对奶牛及其后代微生物群落之间的互动产生了一些障碍。Jost 等[63]在调查试验中发现，149只新生犊牛在出生后被灌服初乳、混合初乳或初乳替代品。因此，母亲与后代间的微生物传播被破坏，而这种微生物传播在后代的肠道微生物群的演变中即将发挥的相关功能也可能丧失。牛场对新生犊牛的管理中，应注意饲喂的初乳和牛奶的质量，应考虑到健康、营养均衡且具有微生物的母乳对后代免疫系统的发育至关重要。事实上，当犊牛处于胁迫条件下时，例如在密集饲养系统中，很可能导致肠道微生物群失衡，例如乳杆菌和双歧杆菌的减少以及病原微生物的增加[63]。Maldonado 等[64]研究发现，将全脂牛奶喂给犊牛，在其肠道中发现了比例增加的乳酸菌与大肠杆菌，这进一步证明了牛奶对犊牛肠道微生物群体的复杂作用。

在出生后 6 h 内，应为新生犊牛提供干净、高质量的初乳。然而，许多农场使用不可食用的废奶，用于出生后犊牛喂养。废奶是不能出售供人食用的牛奶，通常来自具有高 SCC 的奶牛和用抗生素治疗奶牛的牛奶[65]。向犊牛喂养废奶是一种普遍现象，Collado 等[66]在调查中发现，2002 年，美国有 87.2%的奶牛场都有将废奶饲喂给犊牛的现象。大多数牛场认为废奶的使用可以节约经济成本，并且也是安全的牛奶替代品，特别是在巴氏杀菌后。但事实上，废牛奶中的抗生素残留以及潜在的有害病原体污染物都会对犊牛健康的肠道微生物菌落造成很大程度上的破坏。Akyol 等[67]评估了饲喂废奶对犊牛粪便微生物菌群多样性的影响，结果表明，随着年龄增长，不同种类的微生物多样性在犊牛粪便中逐渐增多，如沙门氏菌和梅毒螺旋体（*Treponema pallidum*），而肠胃中重要的有益菌嗜酸杆菌（*Eosinophil*）含量减少。

然而，废奶更危险的因素是抗生素残留物以及可用于转移到病原体的抗生素抗性基因（ARG）池中的潜在富集物的存在[68]。此外，连续的抗生素压力可能增加 ARG 转移的机会。Liu 等[69]采用抗生素残留的奶样饲喂新生小鼠，灌服 24 h 后通过口服给药与静脉给药方式将氨苄青霉素和四环素注入小鼠体内。结果发现，口服给药导致氨苄青霉素抗性基因拷贝数增加 4 倍，而静脉内给药导致四环素抗性基因拷贝数增加 2 倍。这也可能是由于静脉内给药的氨苄青霉素通过尿液清除并且不与肠道微生物群相互作用。Baldassarre 等[70]评估了抗生素残留牛奶对犊牛的粪便微生物群的影响，使用 Illumina MiSeq 对 6 周龄犊牛的粪便进行微生物 16S rDNA 基因的测序，结果表明，牛奶中药物残留的存在会影响粪便中微生物群落的组成，提示即使微量的抗生素也可能对微生物之间的竞争产生选择性影响，即抗生素残留物可以对不具有或含量非常低的 ARG 的未成熟微生物群发挥选择性压力，使得外源微生物进入犊牛机体进行定殖导致突变，逐渐演变成犊牛常见微生物群的特征，进而破坏犊牛胃肠道内正常微生物群的发育及功能。

还有一种能干扰牛奶微生物群落平衡的行为是通过在干奶或哺乳期间对奶牛进行乳房内抗生素治疗[71]。这种做法被认为比在干奶期预防感染而进行的选择性治疗更有效。乳腺内抗生素治疗是轻度和中度乳腺炎病例的最常见治疗方法，通常是在不知道引起感染的细菌类型的情况下使用[72]。然而由于担心抗生素耐药性的选择，这个方法在北欧国家几十年来一直没有实施，并且在荷兰也越来越多地被放弃。这种做法对牛奶微生物群和对 ARG 的潜

在选择的影响值得进一步研究。

6 小结与展望

分子生物学技术的巨大进步使得人类在微生物群落的研究中取得了许多突破，进而使我们意识到栖息于生物体内的微生物多样且复杂，同时这些微生物与其宿主之间还存在着相互的关联作用。牛奶中的微生物群落与牛奶 SCC、生物标记物（表达蛋白、血液因子等）一样是能够反映奶牛及后代生理健康与乳品质量的重要生物指标。奶牛“肠道—乳腺通路”的存在，证明母体微生物群落影响犊牛胃肠道的发育及健康的重要性，而废奶的使用又极大程度地破坏了犊牛胃肠道的微生物群落结构以及功能。这些问题可能对奶牛健康以及乳业的发展造成的重大经济影响。因此，对牛奶微生物群的进一步深入研究有助于对奶牛乳腺生理代谢以及乳品质量安全产生有更全面的认识，如亚临床乳腺炎和隐性乳腺炎的发病机制、牛场管理对奶牛乳腺及后代健康的影响、肠道作为乳腺炎病原微生物储库的作用以及如何控制抗生素耐药性等。

参考文献：

[1] ENDESFELDER D,ZU C W,ARDISSONE A,et al.Compromised gut microbiota networks in children with anti-islet cell autoimmunity[J].Diabetes,2014,63(6):2006–2014.

[2] BRANISTE V,AL-ASMAKH M,KOWAL C,et al.The gut microbiota and the blood-brain barrier permeability in mice[J].Science Translational Medicine,2014,6(263):263ra158.

[3] HAMADY M,KNIGHT R.Microbial community profiling for human microbiome projects:Tools,techniques,and challenges[J].Genome Research,2009,19(7):1141–1152.

[4] SAVAGE D C.Microbial ecology of gastrointestinal-tract[J].Annual Review of Microbiology,31(1):107–133.

[5] SENDER R,FUCHS S,MILO R.Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body[J].PLoS Biology,2016,14(8):e1002533.

[6] CAO B,STOUT M J,LEE I,et al.Placental microbiome and its role in preterm birth[J].Neoreviews,2014,15(12):e537–e545.

[7] MOR G,KWON J Y.Trophoblast-microbiome interaction:a new paradigm on immune regulation[J].American Journal of Obstetrics and Gynecology,2015,213(4S):S131–S137.

[8] TOLLE A. MASTITIS, the disease in relation to control methods[J]. Doc Int Dairy Fed, 1975.

[9] HOOD L.Tackling the microbiome[J].Science,2012,336(6086):1209.

[10] QUIGLEY L,O'SULLIVAN O,STANTON C,et al.The complex microbiota of raw milk[J].FEMS Microbiology Reviews,2013,37(5):664–698.

[11] LI J,NASIDZE I,QUINQUE D,et al.The saliva microbiome of Pan,and Homo[J].BMC Microbiology,2013,13(1):204.

[12] LAMENDELLA R,VERBERKMOES N,JANSSON J K.'Omics' of the mammalian gut--new insights into function[J].Current Opinion in Biotechnology,2012,23(3):491–500.

[13] KUCZYNSKI J,LAUBER C L,WALTERS W A,et al.Experimental and analytical tools for studying the human microbiome[J].Nature Reviews Genetics,2012,13(1):47–58.

[14] JI H,GREENING D W,KAPP E A,et al.Secretome-based proteomics reveals sulindac-modulated proteins released from colon cancer cells.[J].Proteomics Clinical Applications,2009,3(4):433–451.

[15] SHARPTON T J.An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data[J].Frontiers in Plant Science,2014,5:209.

[16] Jumpstart consortium human microbiome project data generation working group.Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research[J].PLoS One,2012,7(6):e39315.

[17] LIU Z,DESANTIS T Z,Andersen G L,et al.Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers[J].Nucleic Acids Researth,2008,36(18):e120.

[18] SCHLOSS P D.The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies[J].PLoS Computayional Biology,2010,6(7):e1000844.

[19] ACINAS S G,MARCELINO L A,KLEPAC-CERAJ V,et al.Divergence and redundancy of 16S rDNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons[J].Journal of

Bacteriology,2004,186(9):2629–2635.

[20] FRANZOSA E A,MORGAN X C,SEGATA N,et al.Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2014,111(22):E2329–E2338.

[21] GODZIK A.Metagenomics and the protein universe[J].Current Opinion in Structural Biology,2011,21(3):398–403.

[22] YOZWIAK N L,SKEWES-COX P,STENGLEIN M D,et al.Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing[J].PLoS Neglected Tropical Diseases,2012,6(2):e1485.

[23] DEUSCH S,TILOCCA B,CAMARINHA-SILVA A,et al.News in livestock research - use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals[J].Computational and Structural Biotechnology Journal,2015,13:55–63.

[24] MENDE D R,WALLER A S,SUNAGAWA S,et al.Assessment of metagenomic assembly using simulated next generation sequencing data[J].PLoS One,2012,7(2):e31386.

[25] SCHMIEDER R,EDWARDS R.Quality control and preprocessing of metagenomic datasets[J].Bioinformatics,2011,27(6):863–864.

[26] GARCIA-GARCER M,GARCIA-ETXEBARRIA K,COSCOLL M,et al.A new method for extracting skin microbes allows metagenomic analysis of whole-deep skin[J].PLoS One,2013,8(9):e74914.

[27] KIM M,LEE K H,YOON S W,et al.Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era[J].Genomics & Informatics,11(3):102–113.

[28] CUI L,MORRIS A,GHEDIN E.The human mycobiome in health and disease[J].Genome Medicine,2013,5(7):63.

[29] BARTRAM A K,LYNCH M D J,STEARNS J C,et al.Generation of multimillion-sequence 16S rDNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads[J].Applied and Environmental Microbiology,2011,77(11):3846–3852.

[30] WHITELEY A S,JENKINS S,WAITE I,et al.Microbial 16S rDNA ion tag and community

metagenome sequencing using the ion torrent (PGM) platform[J].Journal of Microbiological Methods,2012,91(1):80–88.

[31] MASOUD W,VOGENSEN F K,LILLEVANG S,et al.The fate of indigenous microbiota,starter cultures,*Escherichia coli*,*Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR[J].International Journal of Food Microbiology,2012,153(1/2):192–202.

[32] QUIGLEY L,O’SULLIVAN O,BERESFORD T P,et al.Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese[J].International Journal of Food Microbiology,2011,150(2/3):81–94.

[33] MONTEL M C,BUCHIN S,MALLET A,et al.Traditional cheeses:rich and diverse microbiota with associated benefits[J].International Journal of Food Microbiology,2014,177(54):136-154.

[34] FRANZOSA E A,HSU T,SIROTA-MADI A,et al.Sequencing and beyond:integrating molecular ‘Omics’ for microbial community profiling[J].Nature Reviews Microbiology,2015,13(6):360–372.

[35] VALLES-COLOMER M,DARZI Y,VIEIRA-SILVA S,et al.Meta-omics in inflammatory bowel disease research:applications,challenges and guidelines[J].Journal of Crohn’s & Colitis,2016,10(6):735–746.

[36] TVEIT A T,URICH T,FRENZEL P,et al.Metabolic and trophic interactions modulate methane production by Arctic peat microbiota in response to warming[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(19):E2507–E2516.

[37] MCCLURE R,BALASUBRAMANIAN D,SUN Y,et al.Computational analysis of bacterial RNA-SEQ data[J].Nucleic Acids Research,2013,41(14):e140.

[38] GOSALBES M J,ABELLAN J J,DURB N A,et al.Metagenomics of human microbiome:beyond 16S rDNA[J].Clinical Microbiology and Infection,2012,18(4S):47–49.

[39] ABRAM F.Systems-based approaches to unravel multi-species microbial community functioning[J].Computational and Structural Biotechnology Journal,2015,13:24–32.

[40] AHRENS C H,BRUNNER E,QELI E,et al.Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology,2010,11:789–801.

[41] HETTICH R L,PAN C L,CHOUREY K,et al.Metaproteomics:harnessing the power of high performance mass spectrometry to identify the suite of proteins that control metabolic activities in microbial communities[J].Analytical Chemistry,2013,85(9):4203–4214.

[42] MAO L,JACQUELINE F.Symbiosis,dysbiosis,and rebiosis—the value of metaproteomics in human microbiome monitoring[J].Proteomics,2015,15(5/6):1142–1151.

[43] KOLMEDER C A,DE VOS W M.Metaproteomics of our microbiome - developing insight in function and activity in man and model systems[J].Journal of Proteomics,2014,97:3–16.

[44] MUTH T,BENNDORF D,REICHL U,et al.Searching for a needle in a stack of needles:challenges in metaproteomics data analysis[J].Molecular Biosystems,2013,9(4):578–585.

[45] 赵玉琴.关于《食品安全国家标准—生乳》的解读[C]//江苏省计量测试学术论文集.[S.l.]:江苏省计量测试学会，2011.

[46] 刘艳艳.鲜乳细菌总数荧光定量 PCR 检测方法的建立[D].硕士学位论文.长春:吉林大学,2014.

[47] HETTICH R L,SHARMA R,CHOUREY K,et al.Microbial metaproteomics:identifying the repertoire of proteins that microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities[J].Current Opinion in Microbiology,2012,15(3):373–380.

[48] TANCA A,PALOMBA A,PISANU S,et al.A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization[J].Microbiome,2014,2:49.

[49] WINTER G,KR MER J O.Fluxomics-connecting Omics analysis and phenotypes[J].Environmental Microbiology,2013,15(7):1901–1916.

[50] TANG J.Microbial metabolomics[J].Current Genomics,2011,12(6):391–403.

[51] XIONG W L,ABRAHAM P E,LI Z,et al.Microbial metaproteomics for characterizing the range of metabolic functions and activities of human gut microbiota[J].Proteomics,2015,15(20):3424–3438.

[52] YOUNG W,HINE B C,WALLACE O A M,et al.Transfer of intestinal bacterial components

to mammary secretions in the cow[J].PeerJ,2015,3(6):e888.

[53] MORROW A L,RANGEL J M.Human milk protection against infectious diarrhea:implications for prevention and clinical care[J].Seminars in Pediatric Infectious Diseases,2004,15(4):221–228.

[54] BOEHM G,MORO G.Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition[J].The Journal of Nutrition,2008,138(9):1818S–1828S.

[55] PENTTILA I A.Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response[J].Journal of Pediatrics,2010,156(2S):S21–S25.

[56] WALKER A.Breast milk as the gold standard for protective nutrients[J].Journal of Pediatrics,2010,156(2S):S3–S7.

[57] KUEHN J S,GORDEN P J,MUNRO D,et al.Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis[J].PLoS One,2013,8(4):e61959.

[58] ZHANG R Y,HUO W J,ZHU W Y,et al.Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2015,95(5):1072–1079.

[59] CABRERA-RUBIO R,COLLADO M C,LAITINEN K,et al.The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery[J].American Journal of Clinical Nutrition,2012,96(3):544–551.

[60] GUEIMONDE M,LAITINEN K,SALMINEN S,et al.Breast milk:a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?[J].Neonatology,2007,92(1):64–66.

[61] ABREU N A,NAGALINGAM N A,SONG Y L,et al.Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostearicum* enrichment mediates rhinosinusitis[J].Science Translational Medicine,2012,4(151):151ra124.

[62] VANKERCKHOVEN V V,VAN AUTGAERDEN T,HUYS G,et al.Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria[J].Microbial Ecology in Health and Disease,2004,16(2/3):131–136.

[63] JOST T,LACROIX C,BRAEGGER C P,et al.Vertical mother-neonate transfer of maternal gut

bacteria via breastfeeding[J].Environmental Microbiology,2014,16(9):2891–904.

[64] MALDONADO N C,CHIARAVIGLIO J,BRU E,et al.Effect of milk fermented with lactic acid bacteria on diarrheal incidence, growth performance and microbiological and blood profiles of newborn dairy calves[J].Probiotics & Antimicrobial Proteins,2017(Suppl.1):1-9.

[65] KAO J Y. Principles of mucosal immunology $95.00 society for mucosal immunology, principles of mucosal immunology[M].SMITH P, MACDONALD T, BLUMBERG R.Garland Science. New York:[s.n.],2012

[66] COLLADO M C,LAITINEN K,SALMINEN S,et al.Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk[J].Pediatric Research,2012,72(1):77–85.

[67] AKYOL Ç,TURKER G,INCE O,et al.Performance and microbial community variations in thermophilic anaerobic digesters treating OTC medicated cow manure under different operational conditions[J].Bioresource Technology,2016,205:191-198.

[68] OUWEHAND A C,SAXELIN M,SALMINEN S.Phenotypic differences between commercial *Lactobacillus rhamnosus* GG and *L. rhamnosus* strains recovered from blood[J].Clinical Infectious Diseases,2004,39(12):1858–1860.

[69] LIU J,ZHAO Z,ORFE L,et al.Soil-borne reservoirs of antibiotic-resistant bacteria are established following therapeutic treatment of dairy calves[J].Environmental microbiology,2016,18(2):557-564.

[70] BALDASSARRE M E,BELLANTUONO L,MASTROMARINO P,ET AL.Gut and breast milk microbiota and their role in the development of the immune function[J].Current Pediatrics Reports,2014,2(3):218–226.

[71] MATSUMIYA Y,KATO N,WATANABE K,et al.Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus species* from mothers to newborn infants in Japanese,by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J].Journal of Infection and Chemotherapy,2002,8(1):43–49.

[72] RAUTAVA S,LUOTO R,SALMINEN S,et al.Microbial contact during pregnancy,intestinal colonization and human disease[J].Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,2012,9(10):565–576.

Relationship Between Milk Microbial Community and Mammary Gland Health of Dairy Cows as Well as Gastrointestinal Development of Calves

WANG Yue[1] WANG Bing[1] TONG Jinjin[1] JIANG Linshu[1*] XIONG Benhai[2*]

(*1. Key Laboratory of Dairy Nutrition in Beijing, College of Animal Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing* 102206, *China; 2. Beijing Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*)

Abstract: The development in culture-independent techniques and bioinformatics analysis led to a new research view of milk microbial community. It is that milk microbial community has a great diversity and multifaceted biological role, which can directly reflect metabolic level of mammary gland and affect nutritional physiology and health of newborn animals. In this review, thus, we summarized the latest results on milk microbial community, introduced the endogenous hypothetical pathway of milk microorganisms, discussed roles of milk microbial community in mammary gland health of dairy cows and gastrointestinal development of calves, and the application of 16S genomics and meta-genomics in milk microbial studies was also summarized.

Key words: cow mammary gland; microbial community; milk; calf; gastrointestine

*Corresponding authors: JIANG Linshu，professor，E-mail：kjxnb@vip.sina.com；XIONG Benhai，professor, E-mail: xiongbenhai@caas.cn (责任编辑　王智航)